

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08749

研究課題名（和文）ドナー細胞由来白血病の発症にかかわる細胞外小胞の病態生理学的役割の解明

研究課題名（英文）Pathophysiological role of extracellular vesicles in donor cell-derived leukemia

研究代表者

馬場 智久（Baba, Tomohisa）

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：00452095

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、代表的な白血病治療法である、造血幹細胞移植療法を行った際に、稀に発症することが報告されている原因不明の疾患であるドナー細胞由来白血病（DCL）のマウス実験モデルを確立し、その病態生理学的解析から、白血病細胞から分泌される2本鎖DNA断片を高レベルに含有した細胞外小胞が、ドナー造血幹細胞に水平伝播され、その結果、細胞質内DNAセンサーシグナル経路の活性化を介してドナー造血幹細胞の悪性形質転換の原因となっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞移植治療後に、正常であるはずのドナー骨髄細胞から、骨髄異形成症候群（MDS）やAML、ALLなどの種々の白血病が発症するDCLは、原因不明で不可思議な疾患である。また、DCLは、通常の再発白血病と比べて悪性度が高いことから、世界的に臨床上大きな問題となっている。本研究結果から、白血病細胞由来の細胞外小胞が原因の一つとなっている可能性が強く示唆されており、DCLの病態解明にかかわる重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established an experimental mouse model of donor cell-derived leukemia (DCL), a rare disease that is known to occur after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Pathophysiological analysis revealed that extracellular vesicles derived from leukemia cells, which contain high levels of double-stranded DNA fragments, are horizontally transferred to donor HSCs. This transfer leads to the malignant transformation of donor HSCs through the activation of the cytosolic DNA sensor signaling pathway.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：細胞外小胞 細胞質内DNAセンサー 造血幹細胞移植療法

1. 研究開始当初の背景

ドライバー遺伝子の変異により、多分化能をもつ正常造血幹細胞 (HSC) や前駆細胞 (HPC) から生じた白血病幹細胞 (LIC) の増殖が、白血病の本態と考えられている。これまでに多数のドライバー遺伝子変異が同定され、それを標的とした分子標的治療法の開発が進められている。しかし、急性骨髄性白血病 (AML) や急性リンパ性白血病 (ALL) などの病態の多様性に加え、同一病態内での原因遺伝子の多様性や、同一患者内における LIC の heteroclonality も報告されている。したがって、治療効果が高い分子標的治療を行っても、LIC を完全に排除し、白血病を根治することは困難であると考えられる。

これらの問題点を解決するために、理論的には LIC の根絶が可能であり、古くから白血病の根治療法の一つとして行われてきた造血幹細胞移植療法が、改めて注目されており、移植治療件数は年々増加している。しかし、治療後の白血病の再発に加え、まれではあるものの、正常であるはずの移植した骨髄細胞から、骨髄異形成症候群 (MDS) や AML、ALL などの種々の白血病が発症するドナー細胞由来白血病 (donor cell-derived leukemia; DCL) の発症も報告されている。DCL は、通常の再発白血病と比べて悪性度が高いことから、臨床上大きな問題となりつつある (Bone Marrow Transplantation 2014 49:102-109)。しかし、DCL については、その病態を解析するための実験モデルが開発されていないため、その発症メカニズムは未解明であり、現時点で臨床的な予防方法は検討されていない。したがって、DCL 実験モデルの確立とそれをを用いた病態解明が急務となっている。

2. 研究の目的

研究代表者は、マウス慢性骨髄性白血病 (CML) モデルを用いて、ドナーとレシピエントを識別するために CD45.1 陽性コンジェニックマウスから採取した骨髄細胞をドナーとして骨髄移植治療を行ったところ、一旦は正常に生着した CD45.1 陽性ドナー細胞に MDS に類似した異型性変化が生じ、その後重度の貧血によりレシピエントマウスの生存率が急激に低下することを見出した。この予備的結果を踏まえ、DCL 実験モデルの確立とその病態解明を目的とした研究計画を立案した。

3. 研究の方法

(1) DCL 実験モデルの確立

マウス CML モデルを用いて骨髄移植治療を行い、定期的に血液検査を実施した。その結果から、以下の点を指標として MDS 様 DCL の発症の有無を検証した。

MDS 様 DCL: 赤血球数の減少による重度の貧血、血小板減少、白血球の核異型など

(2) DCL 発症メカニズムの解明と細胞外小胞の関与の検討

ホモジナイズした CML マウスの脾臓組織懸濁液、ならびに CML、AML 細胞の培養上清から、遠心分離法により、細胞外小胞をサイズ別に分離した。

(遠心分離) large 細胞外小胞: 10,000 x g, small 細胞外小胞: 100,000 x g

分離した細胞外小胞を用いて、以下の点を検証し、正常ドナー細胞の悪性形質転換への関与を検討した。

正常造血幹・前駆細胞 (HSPC) による細胞外小胞の取り込み能

細胞外小胞との共培養による HSPC の遺伝子発現パターンとコロニー形成能の変化

DCL の発症の原因となっている、白血病細胞由来細胞外小胞に特徴的に内包されている物質の特定

(3) DCL の発症予防効果の検証

実験項目 2 の解析から、白血病細胞から分泌された細胞外小胞は、共通して 2 本鎖 DNA 断片を高レベルで含有しており、これを取り込んだ正常 HSPC において、stimulator of interferon genes (STING) を介した細胞質内 DNA センサー経路が活性化され、悪性形質転換を誘導している可能性が示唆された。この結果を踏まえ、実験項目 1 で確立した DCL 実験モデルを用いて、STING 遺伝子欠損マウスから採取した骨髄細胞をドナーとして骨髄移植し、DCL の発症が抑制されるかを検証した。

(4) オートファジー阻害剤による抗白血病細胞作用の検討

本研究計画を遂行する過程で、正常細胞と比較して白血病細胞では、過剰な細胞増殖過程で核内から細胞質に DNA 断片が逸脱していることを見出した。細胞質内 DNA は damage-associated molecular patterns (DAMPs) として細胞毒性があることが知られているため、白血病細胞が細

胞質内 DNA を細胞外小胞による放出、もしくはオートファジー経路により分解処理することで恒常性を維持している可能性を勘案した。

複数の CML・AML 細胞株を用いて、各種オートファジー阻害剤による抗白血病作用を検討した。同時に STING 遺伝子特異的 shRNA を用いて、正常 HSPC において観察された STING 依存的な細胞質内 DNA センサー経路が、白血病に対する細胞傷害においても関与しているかを検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞外小胞を介した DNA 断片の水平伝播によるドナー細胞の悪性形質転換と DCL の発症

CML を発症したマウスに、5Gy で X 線照射した後に、CD45.1 陽性骨髄細胞を移植したところ(図 1a)、BCR-ABL+白血病細胞はほとんど死滅し、一旦はドナー由来の正常造血系が再構築された(図 1b)。その後、長期的に観察したところ、約 80%のレシピエントマウスが重度の貧血によって死亡した(図 1c)。血液病理学的に詳細に解析したところ、発症マウスの血液、骨髄内において MDS で特徴とされる核異型をもった未分化骨髄球を多数観察した。

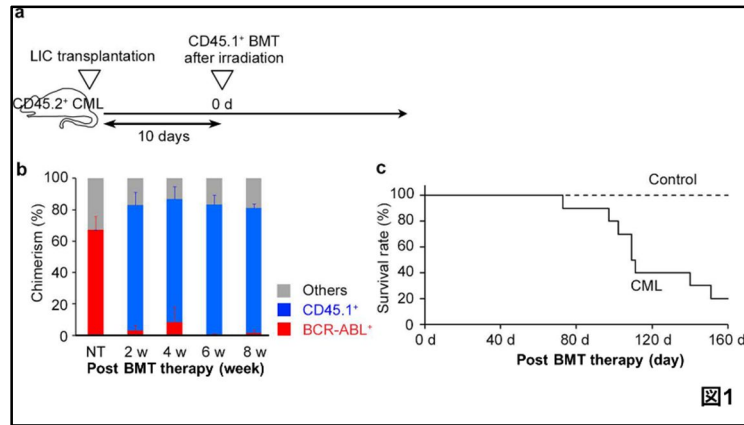


図1

このマウスモデルを用いて、ドナー細胞の MDS 様悪性形質転換のメカニズムを解析したところ、白血病細胞から恒常的に分泌される細胞外小胞が原因となっていることを見出した。正常細胞と比較して、白血病細胞由来細胞外小胞には、DNA 断片が高レベルに含有されており、これを取り込んだ正常 HSC では、STING 依存的な細胞質内 DNA センサー経路が活性化し、造血能の評価となるコロニー形成能が著しく阻害されることを明らかにした(図 2)。

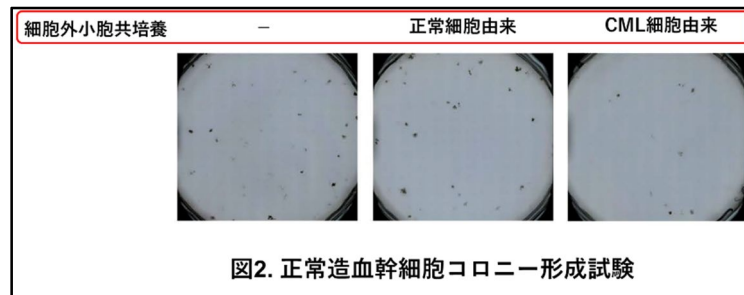


図2. 正常造血幹細胞コロニー形成試験

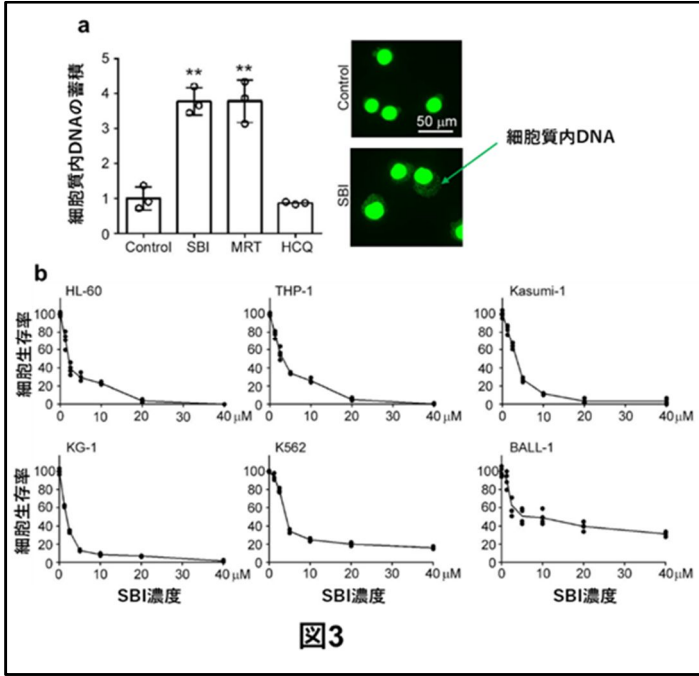
STING を遺伝子欠損したマウス由来の骨髄細胞をドナーとして用いた場合、野生型と比較して、MDS の発症が著しく抑制されたことから、白血病細胞から正常 HSC への細胞外小胞による DNA 断片の水平伝播が、MDS 様の悪性形質転換の誘導に必須の役割を担っていることが示唆された。これらの結果は、学術雑誌 (Cell Death and Disease) に掲載され、造血幹細胞移植治療後に、正常であるはずのドナー細胞が新たに悪性形質転換するという原因不明の疾患である、DCL の病態解明にかかわる重要な知見として世界的に注目されている。

(2) オートファゴソーム形成阻害による細胞質内 DNA 断片の蓄積と抗白血病作用

白血病細胞は、過剰な細胞増殖ともなって、核から細胞質に DNA 断片が逸脱していることを見出した。細胞質内に蓄積した DNA 断片は、DAMPs として細胞毒性があるため、白血病細胞は細胞外小胞による放出、ならびにオートファジー経路により分解処理することで恒常性を維持している可能性を勘案した。

AML・CML の複数のヒト細胞株を対象に、各種オートファジー阻害剤を処置した結果、オートファゴソーム形成阻害剤、MRT-68921 や SBI-0206965 を処置することによって、細胞質内に DNA 断片が蓄積し、白血病細胞選択的に細胞傷害を誘導することを認めた。一方で、オートファジー経路の後期過程である、オートリソソーム機能の阻害剤、Hydroxychloroquine (HCQ) の処置では DNA 断片の蓄積による細胞傷害は誘導されなかった(図 3)。分子メカニズムとしては、細胞質内に蓄積した DNA 断片が、結果項目 1 と同様に STING 依存的な細胞質内 DNA センサー経路を活性化し、reactive oxygen species の産生が亢進することで細胞傷害を誘導していることを明らかにした。

マウス AML モデルを用いた薬剤治療実験においても、白血病細胞数の有意な減少とともに生存率の延長を観察しており、骨髄性白血病に対する新たな治療戦略として期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zoshima Takeshi, Baba Tomohisa, Tanabe Yamato, Ishida Yuko, Nakatani Kimihiko, Nagata Michio, Mukaida Naofumi, Kawano Mitsuhiro	4. 巻 in press
2. 論文標題 CCR2- and CCR5-mediated macrophage infiltration contributes to glomerular endocapillary hypercellularity in antibody-induced lupus nephritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/keab825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Baba Tomohisa, Yoshida Takeshi, Tanabe Yamato, Nishimura Tatsunori, Morishita Soji, Gotoh Noriko, Hirao Atsushi, Hanayama Rikinari, Mukaida Naofumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Cytoplasmic DNA accumulation preferentially triggers cell death of myeloid leukemia cells by interacting with intracellular DNA sensing pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-021-03587-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanabe Yamato, Kawamoto Shimpei, Takaku Tomoiku, Morishita Soji, Hirao Atsushi, Komatsu Norio, Hara Eiji, Mukaida Naofumi, Baba Tomohisa	4. 巻 4
2. 論文標題 Expansion of senescent megakaryocyte-lineage cells maintains CML cell leukemogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 6175 ~ 6188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Di, Iwabuchi Sadahiro, Baba Tomohisa, Hashimoto Shin-ichi, Mukaida Naofumi, Sasaki So-ichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Involvement of a Transcription factor, Nfe2l3, in Breast Cancer Metastasis to Bone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3003 ~ 3003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12103003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mukaida Naofumi、Sasaki So-ichiro、Baba Tomohisa	4. 巻 21
2. 論文標題 Two-Faced Roles of Tumor-Associated Neutrophils in Cancer Development and Progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3457 ~ 3457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 馬場智久、城村由和
2. 発表標題 Cytosolic DNA-sensor signaling potentiates AML differentiation therapy to induce an irreversible cell differentiation
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬場智久
2. 発表標題 Autophagy inhibitor selectively induces cytotoxicity against myeloid leukemia cells by accumulating cytosolic DNA.
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬場智久、向田直史
2. 発表標題 慢性骨髄性白血病のTKI治療に対するオートファジー阻害剤の併用効果
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属分野ホームページ
<https://www.csb-kucri.com/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------